

# 母鼠高脂饮食致子代大鼠胰岛素抵抗的研究

赖 朋, 杨 潇, 刘振平, 唐远谋, 饶 夙, 文春娟, 焦士容, 雷 激, 陈祥贵\*

(西华大学生物工程学院, 四川 成都 610039)

**摘 要:** 研究母鼠高脂饮食导致子代大鼠产生胰岛素抵抗(IR)的机制, 包括母体高脂饮食摄入造成子代大鼠发育编程异常和成年后的代谢疾病, 以及对子代大鼠骨骼肌和脂肪组织发育相关基因的影响。将雌性SD大鼠随机分为2组, NC组喂以标准饲料, 高脂组喂以高脂饲料, 整个过程监控动物体质量、生化指标、口服糖耐量(OGTT)并计算胰岛素敏感指数(ISI)。与正常雄鼠交配后, 繁殖子鼠按性别和母鼠来源分为4组: 正常雌性组、正常雄性组、高脂雌性组和高脂雄性组。子代大鼠断奶后喂以标准饲料18周, 同样监控体质量、生化指标、OGTT和ISI。处死动物后, 获取股四头肌并观察其细胞核和线粒体形态。另外检测子代大鼠在胚胎和胎儿阶段的脂肪和肌肉发育的基因表达情况。结果表明: 高脂母鼠及其子鼠显示出明显的IR症状, 而母鼠高脂饮食摄入使子鼠在胚胎胎儿阶段的脂肪和肌肉发育的基因表达受到严重干扰。研究结果说明, 高脂的宫内环境可能通过影响脂肪和肌肉发育导致子鼠产生IR。

**关键词:** 高脂饮食; 胰岛素抵抗; 脂肪组织; 骨骼肌; 基因表达; 大鼠

## Maternal High-fat Diet Exposure Leads to Insulin Resistance and Impacts Skeletal Muscle and Adipose Tissue Gene Expression in Offspring-rats

LAI Peng, YANG Xiao, LIU Zhen-ping, TANG Yuan-mou, RAO Su, WEN Chun-juan, JIAO Shi-rong, LEI Ji, CHEN Xiang-gui\*

(School of Bioengineering, Xihua University, Chengdu 610039, China)

**Abstract:** To explore the molecular mechanisms of insulin resistance (IR) in offspring-rats under maternal high-fat diet exposure, we investigated whether maternal high-fat diet consumption can result in offspring malprogramming and the onset of metabolic diseases in adulthood, and can impact skeletal muscle and adipose tissue gene expression. Sprague-Dawley female rats were randomly divided into two groups and fed either a normal rodent chow (NC) or high-fat diet (HF). The body weights of the rats were monitored and plasma parameters, oral glucose tolerance test (OGTT), insulin sensitivity index (ISI) were measured. After mating with normal adult male rats, the pups of HF and NC female rats were divided into four groups according to dams and gender: male offspring of maternal HF (MOH), female offspring of maternal HF (FOH), male offspring of maternal NC (MON) and female offspring of maternal NC (FON). Offspring-rats were fed NC until 18 weeks after weaning and weighed weekly. Plasma parameters, OGTT and ISI of offspring-rats were obtained and the morphology of nuclei and mitochondria from left quadriceps cells in offspring-rats was observed. During the embryonic and fetal period, the expression of 10 marker genes related to adipogenesis and myogenesis was detected. The results showed that maternal high-fat diet exposure revealed obvious IR in MOH and FOH. The expression of adipogenetic and myogenetic genes was disrupted seriously in MOH and FOH. As a consequence, maternal high-fat diet exposure leads to IR in offspring rats through impacting the expression of adipogenetic and myogenetic genes.

**Key words:** maternal high-fat diet exposure; insulin resistance; adipose tissue; skeletal muscle; gene expression; rat

中图分类号: R587.1; Q493.4

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2013)23-0282-09

doi:10.7506/spkx1002-6630-201323057

代谢综合征(metabolic syndrome, MS)是多种代谢成分异常聚集的病理状态, 是一组复杂的代谢紊乱症候群, 是导致糖尿病心脑血管疾病的危险因素, 其发生可

能与胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)有关<sup>[1]</sup>。IR的易感性与遗传有一定的关系, 但是如今发病率的迅猛上升说明当代社会人们的不健康生活方式才是导致IR的重要因

收稿日期: 2013-07-17

基金项目: 国家自然科学基金项目(30972484)

作者简介: 赖朋(1979—), 男, 讲师, 博士, 研究方向为心血管分子药理及新药评价。E-mail: lai211@sina.com

\*通信作者: 陈祥贵(1967—), 男, 教授, 博士后, 研究方向为食品营养保健、食品安全、食品/药物生物技术。

E-mail: chenxianggui@hotmail.com

素, 尤其是不合理的饮食结构, 如高糖高脂食物的过量摄入<sup>[1-5]</sup>。

根据“成人疾病的胎儿起源”理论(developmental origins of health and disease, DOHaD), 在妊娠阶段的不合理饮食将使后代成年后发生IR及高血压、糖尿病、冠心病、卒中等疾病的风险明显增高<sup>[6]</sup>。现在习惯以“编程”的概念来表示早期环境因素诱发的生物学变化及其对生命的远期影响, 根据此理论, 成人患心脑血管疾病、糖尿病、肥胖症、高血压、动脉粥样硬化等代谢综合征疾病与其在胎儿时期所处的宫内不良环境有关, 胎儿面临不利因素而做出的适应性调整将致其机体发生永久性的改变<sup>[7]</sup>。这也在一定程度上解释了IR和MS发病率迅速升高的原因。目前, DOHaD已经成为研究热点, 很多研究证实, 在妊娠阶段胎儿营养不良或过剩都会对其成长造成影响, 增加其在成年后IR的发病率<sup>[8-10]</sup>, 动物实验和流行病学调查上都得出了相似的结论<sup>[11-14]</sup>。

人体骨骼肌是维持体内葡萄糖稳态的重要组织, 也是胰岛素作用的主要靶点<sup>[15]</sup>, IR在骨骼肌的产生与糖代谢的紊乱密切相关<sup>[16]</sup>, II型糖尿病的重要特征之一正是骨骼肌严重的IR和由胰岛素介导的葡萄糖处置率受损<sup>[17-18]</sup>。而脂肪组织已经被认为是极为活跃的代谢和内分泌调节器官, 与脂代谢和血糖调节关系密切, 其功能异常对IR的发病和进展起着重要的作用<sup>[19]</sup>。胎儿阶段是这两种组织, 尤其是骨骼肌发育的关键时期, 胎儿时期骨骼肌或脂肪组织发育受到干扰将造成糖脂代谢紊乱, 增加成年后代谢相关疾病尤其是IR的发病危险<sup>[20]</sup>。

总之, 妊娠期及哺乳期的高脂、高糖饮食的摄入会导致宫内营养过剩, 造成胎儿体质量超标, 增加其成年后罹患IR及MS的几率。这种结果可能是由宫内高脂环境干扰了胎儿骨骼肌和脂肪组织的发育, 使其功能受损所造成。本研究通过对怀孕大鼠进行高脂饮食的饲养, 形成营养过剩的宫内环境, 考察子代大鼠产生IR的情况和胚胎、胎鼠、哺乳期的子代大鼠骨骼肌和脂肪组织的相关基因表达情况, 为揭示IR发病的分子机制提供线索。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料、试剂与仪器

6周龄雌性Sprague-Dawley(SD)大鼠60只(体质量(60±10)g, SPF级)购自四川省中医药科学院中药研究所实验动物中心。

基础饲料: 玉米粉10%、小麦粉46%、麦麸11.2%、鱼粉5.2%、豆粕18.4%、骨粉2%、食盐2%、二氧化硅0.2%、淀粉2.8%、玉米油2.2%, 购自四川省中医药科学院中药研究所实验动物中心; 高脂饲料: 普通饲料

60%、猪油14%、奶粉5%、花生5%、鸡蛋10%、蔗糖5%、麻油1%。

大鼠胰岛素酶联免疫分析试剂盒、大鼠瘦素酶联免疫分析试剂盒、大鼠糖原合酶激酶-3 $\beta$ 酶联免疫分析试剂盒 北方生物技术研究; Trizol试剂 上海闪晶生物; AMV反转录酶、T4DNA连接酶 美国Promega公司; dNTP 上海华美生物工程公司; 胶回收试剂盒 美国Omega公司; 琼脂糖凝胶 英国Oxoid公司; Loading Buffer 日本TaKaRa公司; 引物合成由上海英骏生物技术有限公司完成; RNA提取试剂(Trizol) 上海闪晶分子生物科技有限公司; DEPC水、Tris饱和酚 北京鼎国生物有限公司。

AU2700全自动生化仪 日本Olympus公司; H600IV透射电子显微镜 日本Hitachi公司; 7300实时荧光定量PCR仪 美国ABI公司; 电泳系统、Model680酶标仪 美国Bio-Rad公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 动物处理

6周龄SD雌鼠30只基础饲料适应性喂养1周后, 按照体质量随机分成普通饲料组(NC组, 15只)和高脂饲料组(HF组, 15只)。NC组大鼠全程喂养基础饲料, HF组大鼠全程喂养高脂饲料。从分组后的第1周开始每周记录大鼠体质量, 于分组后的第7、10、13周尾静脉取血, 测定相关生化指标, 并进行口服葡萄糖耐量实验(OGTT)。两组雌鼠喂养至第13周与正常健康成年SD雄鼠交配, 受孕至哺乳期期间仍用各组原饲料喂养。仔鼠出生后每窝随机各留8只(雌、雄各4只)进行哺乳, 断乳后在保证每窝都有子代大鼠进行饲养的原则随机选取NC组和HF组子代大鼠雌雄各10只, 共40只, 均用基础饲料喂养至18周龄。子代大鼠每周称量体质量, 并于25日龄、60日龄、120日龄空腹取尾血, 测定相关生化指标, 同时进行OGTT。喂养至18周龄后处死, 取血清测定糖原合酶激酶-3 $\beta$ (GSK), 观察骨骼肌细胞细胞核和线粒体结构形态。

另取6周龄SD雌鼠30只按上述方法分组喂养至第13周时, 与正常健康成年SD雄鼠交配, 以观察阴道栓和阴道涂片确定母鼠怀孕0.5d, 受孕至哺乳期期间仍然用各组原饲料喂养。怀孕12d时, 每组取3只孕鼠, 乙醚麻醉, 取出子宫置于盛有PBS的培养皿中, 将胚胎与胎膜和胎盘剥离。怀孕19d时, 每组取3只孕鼠, 乙醚麻醉, 取出胎鼠置于盛有PBS的培养皿中, 取腿部肌肉置于盛有PBS的培养皿中。每组取3只断乳6d子鼠乙醚麻醉后, 取双侧后肢股四头肌于培养皿中, 用PBS液反复洗涤3次。所取上述组织用于检测子代大鼠各发育阶段相关基因表达情况。

#### 1.2.2 生化参数测定

空腹血糖(FBG)、空腹总胆固醇(TC)、空腹甘油三酯(TG)的浓度采用全自动生化仪测定; 空腹血胰岛素

(FINS)、空腹血瘦素(FLP)、血清糖原合酶激酶-3 $\beta$ (GSK)浓度采用相关的大鼠ELISA试剂盒测定。

1.2.3 胰岛素敏感指数和口服糖耐量测定

胰岛素敏感指数(ISI)按式(1)<sup>[19]</sup>计算:

$$ISI = \ln(1/(FBG \times FINS)) \quad (1)$$

式中:FBG为空腹血糖值/(mmol/L);FINS为空腹血胰岛素/(pmol/L)。

口服糖耐量(OGTT)测试采取以下方法:大鼠隔夜禁食12~14h,采尾血用血糖仪测定空腹血糖(0min的血糖值),按体质量2g/kg给予50%葡萄糖溶液灌胃,分别在灌胃后30、60、120、180min时,取尾血,测各组大鼠血糖值,按式(2)计算血糖曲线下面积(AUC)。

$$AUC = (FBG + BG_{30min}) \times 30/2 + (BG_{30min} + BG_{60min}) \times 30/2 + (BG_{60min} + BG_{120min}) \times 60/2 + (BG_{120min} + BG_{180min}) \times 60/2 \quad (2)$$

式中:FBG为空腹血糖值/(mmol/L);BG<sub>30min</sub>、BG<sub>60min</sub>、BG<sub>120min</sub>、BG<sub>180min</sub>分别为大鼠经葡萄糖溶液灌胃后30、60、120、180min血糖值/(mmol/L)。

1.2.4 电镜观察

子代各组大鼠腹主动脉取血后处死,迅速切取左侧股四头肌组织,剪成2mm×5mm×10mm左右的组织块,4℃的3%戊二醛预固定,4℃保存。实验时用1%的四氧化钼再固定,丙酮逐级脱水,Epon812包埋,半薄切片光学定位,超薄切片,醋酸铀及枸橼酸铅双染,透射电镜下观察骨骼肌细胞细胞核和线粒体结构形态<sup>[22]</sup>。

1.2.5 引物设计和总RNA分离

组织获取按1.2.1节中所述,按Rugh<sup>[23]</sup>所述方法计算孕期。根据GenBank中登录的LPL、MyoG、Desmin、GPDH、Pref-1、CKM、MyoD1、FABP4、AdipoQ、PPARG基因及管家基因 $\beta$ -actin的序列,Primer Premier5.0软件设计特异性引物如表1。按照Trizol说明书提取总RNA,电泳检测其完整性,紫外分光光度法测定纯度。

表1 脂肪及肌肉发育相关基因引物序列

Table 1 Quantitative PCR primers for adipogenesis, myogenesis and  $\beta$ -actin genes

基因	正向	反向
LPL	GATTTCGTAGATGCTTACACAC	CCTTCTCTGCAATTACACGAATG
GPDH	CCAAGATCGTGGGTAGTAATGC	CGGCAGGTATTTACATTCTCG
FABP4	AGATTTCTCTTCAA ACTGGGCGT	CATGACACATTCCACCACCAGC
Pref-1	CCTGTGTGAGAAGTGCCTAACC	GTACTGGCCTTCTCTGAGGTC
AdipoQ	TGATGGC AGAGATGGCACTCC	CTTCTCCGGGCTCTCTTTTC
PPARG	CCCTTTGGTGACTTTATGGAGC	AGCAAGCCTGGGCGGTCT
MyoG	GGCGTGTAAGGTGTGAAGAGG	TAGGCGCTCAATGTACTGGATG
MyoD1	TGCTCTGATGGCATGATGGAT	GGCAGTCGAGGCTCGACAC
Desmin	CAATGTGAAGATGGCCTTGGGA	GGGTGTTTCTCGGAAGTTG
CKM	CCTGAGCAAGACCCCAAGT	ATCCACCACAGCTGCACCT
$\beta$ -actin	CCTCATGCCATCTGCGTCTG	CTTGCTCGAAGTCTAGGGCAAC

1.2.6 反转录-PCR及荧光定量-PCR

10mL总RNA中加入1 $\mu$ L cDNA引物和AMV反转录

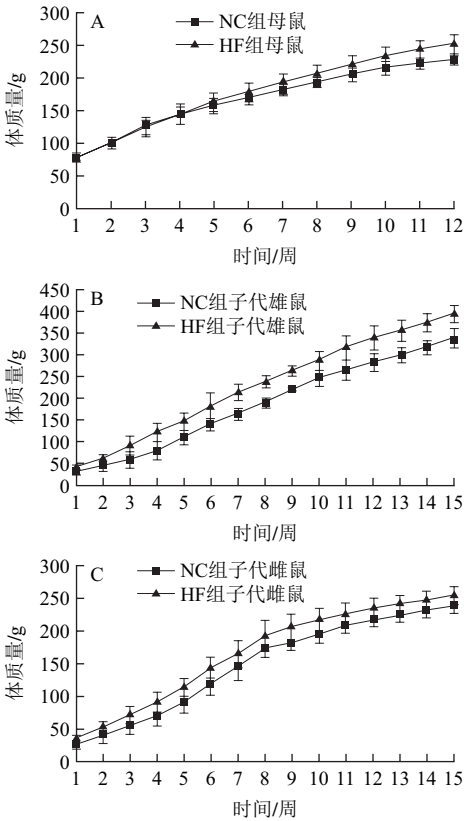
酶,按说明书进行反转录操作,得到的cDNA储存于-20℃。按文献进行常规PCR<sup>[24]</sup>,取5 $\mu$ L反应产物在1.5%的琼脂糖凝胶电泳上进行电泳检测。按DNA凝胶回收试剂盒说明书回收PCR产物并将回收纯化的PCR产物与pGEM-T Easy载体按说明书相连接,连接产物直接用于转化。用Inoue法制备超级感受态细胞<sup>[25]</sup>,再将质粒转染感受态细胞,并按文献<sup>[26]</sup>处理,蓝白斑筛选:挑选白色菌落,提取质粒<sup>[27]</sup>。按试剂盒说明书要求采用荧光染料SYBR Green I标记进行定量-PCR,以10倍系列稀释( $1 \times 10^{-13} \sim 1 \times 10^{-18}$  mol/ $\mu$ L)的阳性标准品为模板,建立标准曲线。NC组和HF组10种相关基因表达由测得相应荧光强度比标准曲线得到。

1.3 统计方法

统计处理用SPSS17.0软件完成。实验数据用“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,母鼠两组数据间采用单因素方差分析;子代大鼠数据采用双因素方差分析,以母鼠饲料(是否高脂)和性别(雌雄)作为变量;体质量数据采用重复测量的方差分析。

2 结果与分析

2.1 体质量变化



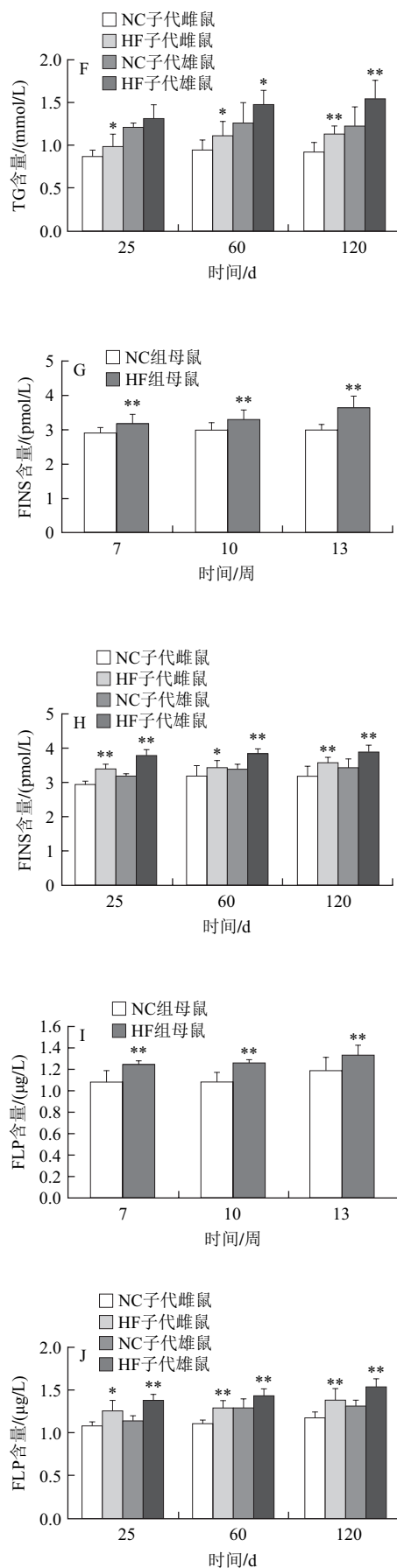
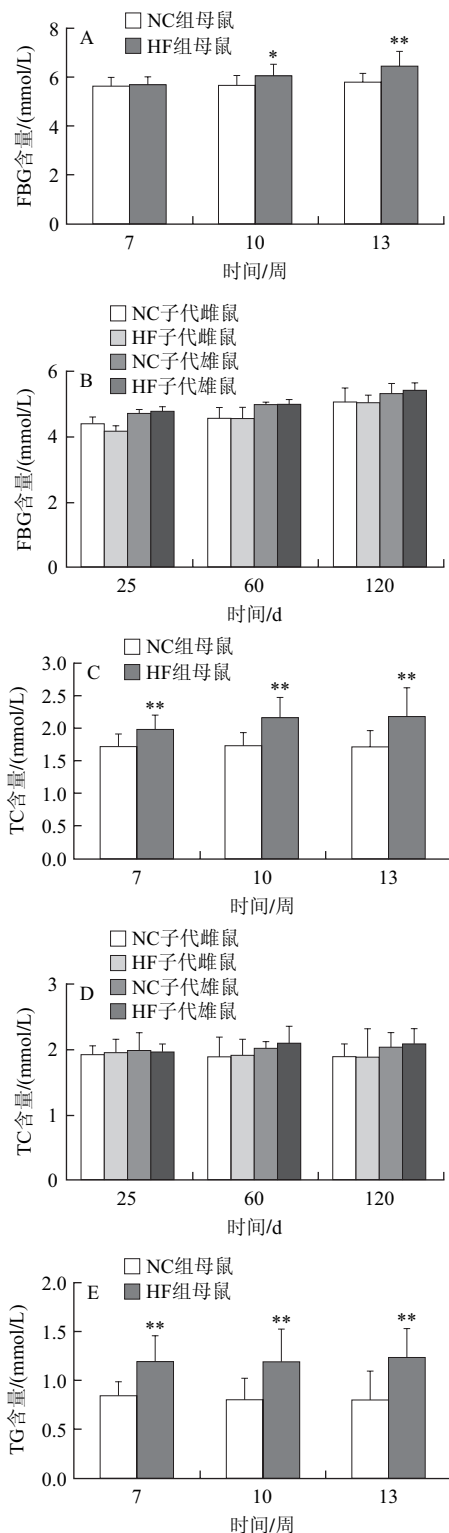
A.母鼠(n=15); B.子代雄鼠(n=10); C.子代雌鼠(n=10)。

图1 母鼠、子代雄鼠和子代雌鼠体质量变化( $\bar{x} \pm s$ )

Fig.1 Changes in body weight of maternal rats (A), male offspring (B) and female offspring (C) ( $\bar{x} \pm s$ )

由图1可知, 相对于NC组, HF组母鼠在饲养过程中体质量增加显著(图1A), 并且此差异随喂养时间延长而加大。子代大鼠体质量变化与母鼠相似, 高脂母鼠的子代无论雌鼠(FOH)还是雄鼠(MOH), 其体质量增加明显大于对照组母鼠的子代(FON和MON) (图1B和C)。

## 2.2 血浆生化参数测定结果





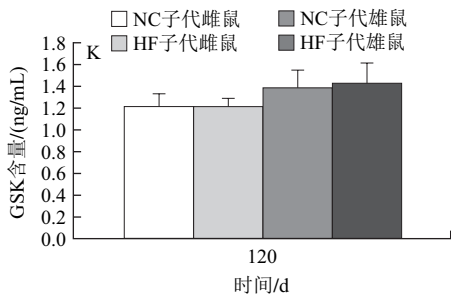


图2 母鼠、子代雄鼠和子代雌鼠血浆生化参数结果

Fig.2 Plasma parameters of mother rats, male offspring and female offspring

由图2可知,除第7周FBG外, HF组母鼠对比NC组在各个时间点,其FBG、TC、TG、FINS和FLP水平均有明显升高(图2A、C、E、G、I)。虽然所有子代大鼠都以基础饲料喂养,但HF母鼠子代在TG、FINS和FLP水平上仍显著高于NC母鼠子代(图2F、H、J),但FBG和TC水平两者并无显著性差异(图2B和D)。从结果可以看出,子代大鼠的性别并未给血浆各个生化指标的变化趋势带来明显差异。

2.3 口服糖耐量和胰岛素敏感指数

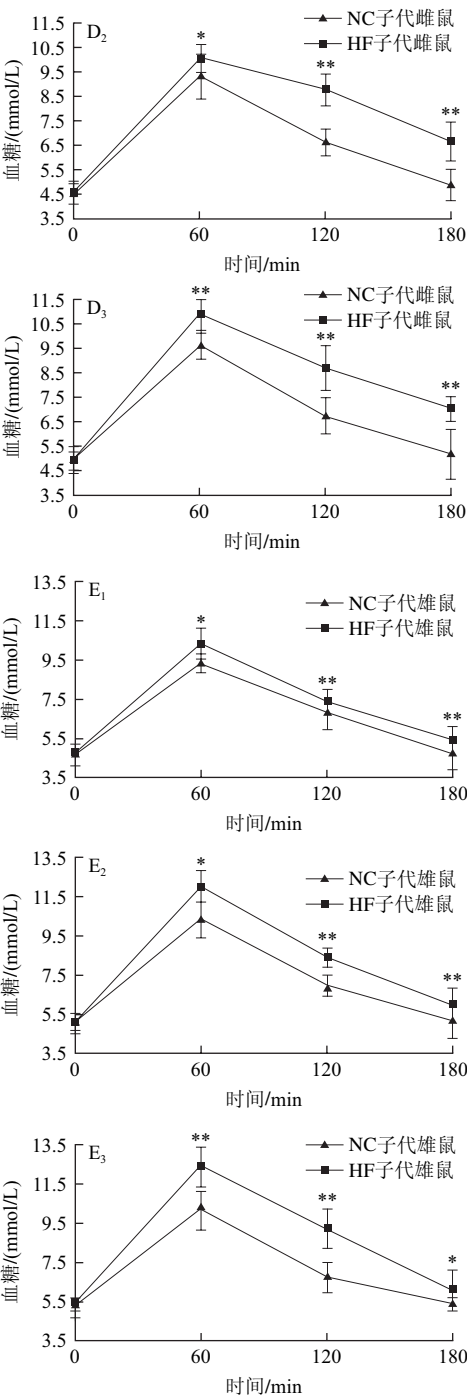
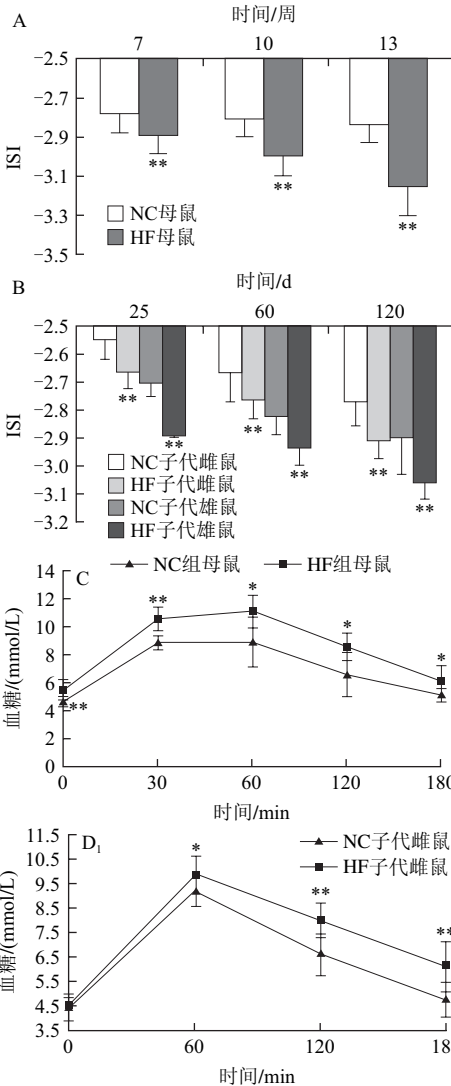


图3 胰岛素敏感指数和糖耐量测定结果  
Fig.3 Insulin sensitivity index and OGTT

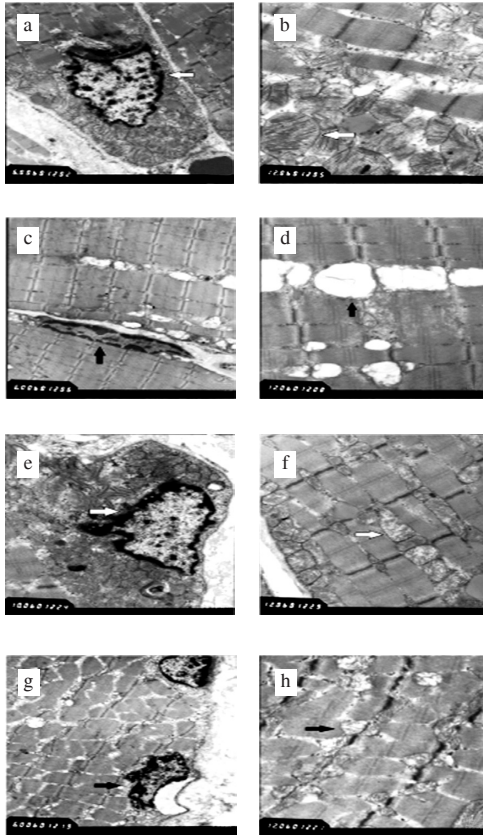
由图3可知,在每个监测时间点, HF组母鼠及其子代大鼠(无论雌雄)与相应的对照组相比,胰岛素敏感指数 (ISI)(图 3A和B)和口服糖耐量(OGTT)(图 3C、D、E)都明显下降,表现为HF组母鼠及其子代血糖AUC也显著大于NC组母鼠及其子代(表2)。

**表 2 母鼠13周及子鼠25、60、120日龄血糖曲线下面积(AUC)结果**  
**Table 2 AUC of blood glucose in 13-week-old dams and 25-, 60-, and 120-day-old pups**

组别	母鼠13周		子鼠25d				子鼠60d				子鼠120d			
	NC	HF	FON	FOH	MON	MOH	FON	FOH	MON	MOH	FON	FOH	MON	MOH
AUC	1252	1556**	1225	1387**	1252	1367*	1284	1525**	1323	1523**	1304	1555**	1319	1625**

注: FON. NC 组子代雌鼠; MON. NC 组子代雄鼠; FOH. HF 组子代雌鼠; MOH. HF 组子代雄鼠。下同。

#### 2.4 骨骼肌细胞细胞核及线粒体形态



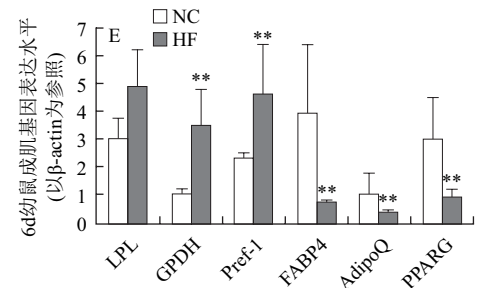
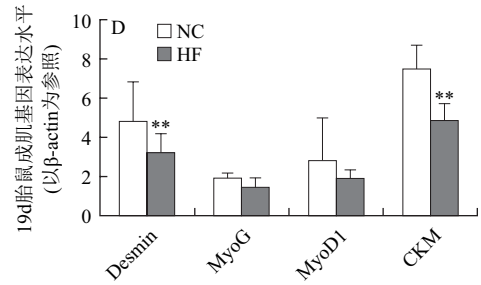
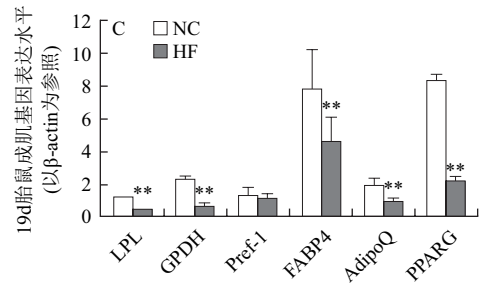
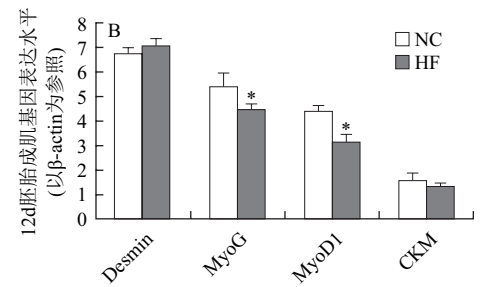
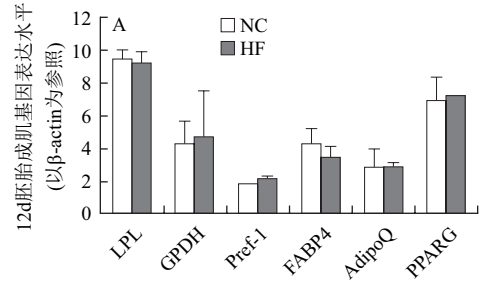
白箭头指示正常的细胞核和线粒体, 黑箭头指示变形的细胞核和巨大化的线粒体以及消失的线粒体嵴。

**图 4 骨骼肌细胞核(a、c、e和g, ×6000)及线粒体形态(b、d、f和h, ×12000)的电镜图片**

**Fig.4 Representative electron photomicrographs of skeletal muscle cell nuclei (a, c, e and g, × 6000) and mitochondria (b, d, f and h, × 12000)**

由图4可知, NC组子代大鼠(FON和MON)骨骼肌肌丝排列整齐, 细胞核呈椭圆形, 核内染色质分布均匀。细胞内可见大量的线粒体, 结构清晰, 肌纤维排列整齐(图4a、e)。在12000倍透射电镜下, 可见正常线粒体呈椭圆形, 外膜完整, 嵴为隔板状, 与线粒体长轴垂直, 内膜内基质电子密度均匀(图4b、f); 而高脂组子代大鼠(FOH和MOH)细胞核呈长条形, 核内染色质边集, 线粒体嵴开始断裂、消失而形成空泡(图4c、g); 而线粒体嵴大量缺失, 已出现肿胀, 由于水肿而形成了大的空泡(图4d和h)。

#### 2.5 子代大鼠在胚胎、胎鼠及断乳阶段骨骼肌和脂肪组织发育相关基因的表达



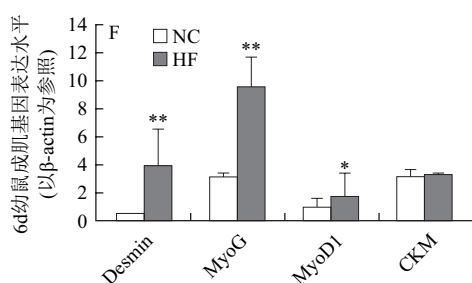


图5 12d胚胎(A和B)、19d胎鼠(C和D)和断乳6d幼鼠(E和F)骨骼肌和脂肪组织发育及分化相关基因的表达

Fig.5 Expression of adipogenesis and myogenesis marker genes in 12-day-old embryos (A and B), 19-day-old fetus (C and D) and post-weaned pups (E and F)

对于子代大鼠骨骼肌及脂肪组织发育和分化的10种相关基因进行RT-PCR分析,由图5可知,在怀孕12d胚胎期,高脂宫内环境轻微抑制了肌肉发育相关的转录因子*MyoG*和*MyoD1*基因表达(图5A和B);但在孕期第19天进入胎鼠阶段,相对于NC组,高脂组大部分基因的表达明显减少,而*MyoD1*、*MyoG*和前脂肪因子(*Pref-1*)的表达量两组没有明显差异(图5C和D);在子鼠断乳后6d,高脂组*GPDH*、*Pref-1*、*Desmin*、*MyoG*和*MyoD1*的表达相对于NC组都有显著的上调,但其*FABP4*、*AdipoQ*和*PPARG*的表达却因高脂环境被抑制(图5E和F)。

### 3 讨论

大多数IR患者伴随着营养代谢异常,这种不正常的代谢模式可能在胎儿早期就已经形成。流行病学研究和动物实验已证实,母体的营养状态能够影响胎儿器官的发育,使其功能永久性的改变,并在成年后增加罹患某些代谢性疾病的几率<sup>[28]</sup>。有研究显示,小鼠在怀孕和哺乳期间摄入过多的营养,尤其是高脂饮食,会导致子代小鼠IR和增加发生代谢综合征的风险<sup>[29]</sup>。

在本研究中,证实了大鼠在怀孕和哺乳期间摄入高脂饮食可使子代产生IR。此外,为探索可能存在的发病机制,本研究使用定量PCR的方法研究了宫内高脂环境对胚胎、胎鼠及幼鼠骨骼肌和脂肪组织发育分化有关基因表达的影响。

母鼠体质量及血浆生化参数结果表明,高脂饮食成功导致高血糖、高脂血症、胰岛素抵抗和瘦素抵抗发生,并形成宫内过营养环境。对比正常子代,高脂母鼠的子代不仅表现出肥胖和出生体质量的增加,而且出现了明显的IR症状,包括高胰岛素血症和高瘦素血症。正是由于高水平的胰岛素和瘦素,高脂子代大鼠的空腹血糖维持在正常水平。然而,口服糖耐量和胰岛素敏感指数显著降低,事实上已经形成IR。尽管所有子代大鼠都

给予普通饲料喂养,但高脂子代仍有明显的高甘油三酯血症,而其总胆固醇保持正常。在此后的研究中,应重视总胆固醇和甘油三酯之间的差异。高血脂,特别是高甘油三酯血症,通常是IR和MS的重要临床指标。值得注意的是,虽然糖原合酶激酶3(GSK-3)升高是引发IR的一个原因<sup>[30]</sup>,但在本研究中,高脂组后代GSK-3水平并没有显著增加(数据未列出)。这表明,抑制糖原的合成及胰岛素信号通路受损可能并非是高脂子代产生IR的机制。

由于骨骼肌作为胰岛素作用的主要位点和处置餐后血糖的主要场所,骨骼肌的IR是IR发病主要原因。透射电镜的研究结果表明,高脂子代大鼠的骨骼肌细胞形态发生了严重的变化,包括呈条状的细胞核以及线粒体形态的改变和数量的减少。总之,孕期及哺乳期的高脂肪摄入对胎儿骨骼肌的发育有很大的影响,使子代出现IR。

定量PCR结果表明,宫内高脂环境可能通过干扰骨骼肌和脂肪组织发育分化的相关基因表达影响上述组织的发育。胚胎期和胎鼠期对于骨骼肌和脂肪组织的发育非常重要,在此期间,增殖和分化的骨骼肌和脂肪细胞对环境更敏感,容易影响其基因的表达<sup>[31]</sup>,结果,骨骼肌和脂肪组织的生理特点将改变,减少对胰岛素的敏感性。在本研究中检测了4种骨骼肌基因(*MyoG*、*Desmin*、*CKM*和*MyoD1*)和6个脂肪组织基因(*LPL*、*GPDH*、*Pref-1*、*FABP4*、*AdipoQ*和*PPARG*)的表达,这些基因与骨骼肌和脂肪组织的发育和分化密切相关。在人类妊娠中期和啮齿类动物妊娠后期,肌纤维和脂肪组织才开始形成<sup>[32]</sup>,因此,在本研究中,大多数基因的表达水平没有显著的改变,除了高脂组胚胎期(12d)的*MyoD1*和*MyoG*被明显抑制。值得注意的是,这两个基因的表达在胎鼠期返回到正常水平。一些研究表明,在中胚层细胞迁移之后,成纤维细胞开始表达一些肌细胞调节因子,如*MyoD1*和*MyoG*<sup>[33]</sup>。因此,本研究结果可能意味着宫内高脂环境可能通过抑制骨骼肌形成的早期事件发生来影响骨骼肌发育,包括成纤维细胞的增殖和定向以及骨骼肌祖细胞的分化。在妊娠后期,高脂组的其他两个肌肉发育相关基因(*Desmin*和*CKM*)的表达也下调。研究表明,这两个基因是成肌细胞分化的标记<sup>[34-35]</sup>,因此结果提示,胎儿成肌细胞的终末分化被过营养的宫内环境所抑制。

脂肪组织也与IR密切相关<sup>[36]</sup>。结果显示,大多数脂肪组织发育的标志基因均显著下调,而此期正是大鼠脂肪细胞分化的主要时期。*PPARG*和*LPL*作为早期脂肪发生的标志物在脂肪细胞分化的早期阶段发挥关键作用<sup>[37]</sup>,其中*PPARG*维持基础的胰岛素敏感性,同时又是一些脂肪发生相关基因的转录因子,如脂肪酸结合蛋白(FABPs)<sup>[38]</sup>。因此,*FABP4*的表达与*PPARG*同时被抑制。其他标志基因如*GPDH*,在脂肪细胞转化的后期开始积累甘油三酯时被诱导表达,也是判断脂肪细胞

终末分化的酶标记物<sup>[39]</sup>。而*AdipoQ*编码脂联素,是一种脂肪特异性基因,在高脂组中与*GPDH*的表达同样显著下调。唯一不同的是,在胎鼠期,高脂组和NC组*Pref-1*的表达没有显著性差异。其结果与预测相符,因为增加*Pref-1*的表达将下调脂肪细胞标志物的表达,减少脂肪细胞分泌细胞因子,包括瘦素和脂联素<sup>[40]</sup>。

出生后高脂组子代大鼠*LPL*和*GPDH*的表达上调,这可能是由于“追赶生长”所造成。然而,与IR密切相关的基因表达仍低于NC组,如*FABP4*、*AdipoQ*和*PPARG*。断奶后的高脂组子鼠*Pref-1*表达水平相对于NC组上调,而以前的研究证实,在成熟的脂肪组织中高表达*Pref-1*可能会降低胰岛素的敏感性。出生后子代大鼠的骨骼肌发育与脂肪细胞发育趋势类似,*Desmin*、*MyoD1*和*MyoG*表达增加。也许,高脂环境导致的关键时期肌肉发育缺陷,激活了卫星细胞,使骨骼肌相关基因再次表达<sup>[41]</sup>。简言之,这些成脂和成肌基因的异常表达可能是造成IR的机制之一。

#### 4 结 论

综上所述,母体高脂饮食导致子代出现IR,并出现如胰岛素敏感指数和口服葡萄糖耐量降低等典型症状。另外,通过电镜可清楚地观察到骨骼肌细胞的细胞核和线粒体的形态改变。结果表明,过营养宫内环境器质性的损伤了子代能量代谢的体系。本研究还显示,在子代发育过程中,母体高脂饮食摄入严重的干扰了成脂和成肌相关基因的表达,并延缓了骨骼肌和脂肪细胞的分化。由于在发育分化的关键期受到干扰,这些异常发育所造成的相关功能下降是不可逆转的,如骨骼肌对胰岛素敏感性差、利用葡萄糖能力差等。毫无疑问,母体高质饮食摄入导致过营养的宫内环境,从而干扰抑制子代骨骼肌和脂肪组织发育分化基因在关键时期的表达,这是造成子代IR的重要机制之一。

#### 参考文献:

- [1] DEFRONZO R A, FERRANNINI E. Insulin resistance. a multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease[J]. Diabetes Care, 1991, 14(3): 173-194.
- [2] LOVEJOY J C, SMITH S R, CHAMPAGNE C M, et al. Effects of diets enriched in saturated (palmitic), monounsaturated (oleic), or trans (elaidic) fatty acids on insulin sensitivity and substrate oxidation in healthy adults[J]. Diabetes Care, 2002, 25(8): 1283-1288.
- [3] MARTIN J F, JOHNSTON C S, HAN C T, et al. Nutritional origins of insulin resistance: a rat model for diabetes-prone human populations[J]. J Nutr, 2000, 130(4): 741-744.
- [4] STORLIEN LH, OAKES N D, PAN D A, et al. Syndromes of insulin resistance in the rat. Inducement by diet and amelioration with benfluorex[J]. Diabetes, 1993, 42(3): 457-562.
- [5] VESSBY B, UNSITUPA M, HERMANSEN K, et al. Substituting dietary saturated for monounsaturated fat impairs insulin sensitivity in healthy men and women: the KANWU study[J]. Diabetologia, 2001, 44(3): 312-319.
- [6] BARKER D J, ERIKSSON J G, FORSEN T, et al. Fetal origins of adult disease: strength of effects and biological basis[J]. Int J Epidemiol, 2002, 31(6): 1235-1239.
- [7] NATHANIELSZ P W, POSTON L, TAYLOR P D. In utero exposure to maternal obesity and diabetes: animal models that identify and characterize implications for future health[J]. Clin Perinatol, 2007, 34(2): 515-526.
- [8] BISPHAM J, GOPALAKRISHNAN GS, DANDREA J, et al. Maternal endocrine adaptation throughout pregnancy to nutritional manipulation: consequences for maternal plasma leptin and cortisol and the programming of fetal adipose tissue development[J]. Endocrinology, 2003, 144(8): 3575-3585.
- [9] BENYSHEK D C, JOHNSTON C S, MARTIN J F. Post-natal diet determines insulin resistance in fetally malnourished, low birthweight rats (F1) but diet does not modify the insulin resistance of their offspring (F2)[J]. Life Sci, 2004, 74(24): 3033-3041.
- [10] SYMONDS M E, PEARCE S, BISPHAM J, et al. Timing of nutrient restriction and programming of fetal adipose tissue development[J]. Proc Nutr Soc, 2004, 63(3): 397-403.
- [11] BETRAM C, HANSON M A. Animal models and programming of the metabolic syndrome[J]. Br Med Bull, 2001, 60(1): 103-121.
- [12] HOLEMANS K, AERTS L, VAN ASSCHE F A. Fetal growth and long-term consequences in animal models of growth retardation[J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 1998, 81(2): 149-156.
- [13] PETRY C J, OZANNE S E, HALES C N. Programming of intermediary metabolism[J]. Mol Cell Endocrinol, 2001, 185(1/2): 81-91.
- [14] van ASSCHE FA, HOLEMANS K, AERTS L. Long-term consequences for offspring of diabetes during pregnancy[J]. Br Med Bull, 2001, 60: 173-182.
- [15] LOWELL B B, SHULMAN G I. Mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes[J]. Science, 2005, 307: 384-387.
- [16] SHELLEY P, MARTIN-GRONERT M S, ROWLERSON A, et al. Altered skeletal muscle insulin signaling and mitochondrial complex II-III linked activity in adult offspring of obese mice[J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2009, 297(3): R675-R681.
- [17] DEFRONZO R A, JACOT E, JEQUIER E, et al. The effect of insulin on the disposal of intravenous glucose: results from indirect calorimetry and hepatic and femoral venous catheterization[J]. Diabetes, 1981, 30(12): 1000-1007.
- [18] KELLEY D, MANDARINO L. Fuel selection in human skeletal muscle in insulin resistance: a re-examination[J]. Diabetes, 2000, 49(5): 677-683.
- [19] STANNARD S R, JOHNSON N A. Insulin resistance and elevated triglyceride in muscle: more important for survival than “thrifty” genes? [J]. J Physiol, 2004, 554(3): 595-607.
- [20] GOOSSENS G H. The role of adipose tissue dysfunction in the pathogenesis of obesity-related insulin resistance[J]. Physiol Behav, 2008, 94(2): 206-218.
- [21] MATSUDA M, DEFRONZO R A. Insulin sensitivity indices obtained from oral glucose tolerance testing: comparison with the euglycemic insulin clamp[J]. Diabetes Care, 1999, 22(9): 1462-1470.
- [22] KELLEY D E, HE J, MENSHIKOVA E V, et al. Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes[J]. Diabetes, 2002, 51(10): 2944-2950.
- [23] RUGH R. The mouse: its reproduction and development[M]. Oxford: Oxford university press, 1990: 253-259.



- [24] BUUS C L, POURAGEAUD F, FAZZI G E, et al. Smooth muscle cell changes during flow-related remodeling of rat mesenteric resistance arteries[J]. *Circ Res*, 2001, 89: 180-186.
- [25] INOUE H, NOJIMA H, OKAYAMA H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids[J]. *Gene*, 1990, 96(1): 23-28.
- [26] BIRNBOIM H C, DOLY J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA[J]. *Nucleic Acids Res*, 1979, 7(6): 1513-1523.
- [27] CHAFFIN D O, RUBENS C E. Blue/white screening of recombinant plasmids in Gram-positive bacteria by interruption of alkaline phosphatase gene (phoZ) expression[J]. *Gene*, 1998, 219: 91-99.
- [28] GLUCKMAN P D, HANSON M A. The developmental origins of health and disease: an overview[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2006, 573: 1-7.
- [29] SAMUELSSON A M, MATTHEWS P A, ARGENTON M, et al. Diet-induced obesity in female mice leads to offspring hyperphagia, adiposity, hypertension, and insulin resistance a novel murine model of developmental programming[J]. *Hypertension*, 2008, 51: 383-392.
- [30] HENRIKSEN E J, KINNICK T R, TEACHEY M K, et al. Modulation of muscle insulin resistance by selective glycogen synthase kinase-3 inhibition in Zucker diabetic fatty rats[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2003, 284(5): E892-E900.
- [31] GREFFE S, KUIJPERS-JAGTMAN A M, TORENSMA R, et al. Skeletal muscle development and regeneration[J]. *Stem Cells Dev*, 2007, 16(5): 857-868.
- [32] DU M, YAN X, TONG J F, et al. Maternal obesity, inflammation, and fetal skeletal muscle development[J]. *Biol Reprod*, 2010, 82(1): 4-12.
- [33] BUCKINGHAM M, BAJARD L, CHANG T, et al. The formation of skeletal muscle: from somite to limb[J]. *J Anat*, 2003, 202(1): 59-68.
- [34] LI H, CHOUDHARY S K, MILNER D J, et al. Inhibition of desmin expression blocks myoblast fusion and interferes with the myogenic regulators *MyoD* and *myogenin*[J]. *J Cell Biol*, 1994, 124 (5): 827-841.
- [35] JAYNES J B, CHAMBERLAIN J S, BUSKIN J N, et al. Transcriptional regulation of the muscle creatine kinase gene and regulated expression in transfected mouse myoblasts[J]. *Mol Cell Biol*, 1986, 6(8): 2855-2864.
- [36] KAHN B B, FLIER J S. Obesity and insulin resistance[J]. *J Clin Invest*, 2000, 106(4): 473-481.
- [37] GREGOIRE F M, SMAS C M, SUL H S. Understanding adipocyte differentiation[J]. *Physiol Rev*, 1998, 78(3): 783-809.
- [38] BIRON-SHENTAL T, SCHAIFF W T, RATAJCZAK C K, et al. Hypoxia regulates the expression of fatty acid-binding proteins in primary term human trophoblasts[J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2007, 197(5): 516.e1-e6.
- [39] SAMUELSSON L, STRÖMBERG K, VIKMAN K, et al. The CCAAT/enhancer binding protein and its role in adipocyte differentiation: evidence for direct involvement in terminal adipocyte development[J]. *Embo J*, 1991, 10(12): 3787-3793.
- [40] LEE K, VILLENA J A, MOON Y S, et al. Inhibition of adipogenesis and development of glucose intolerance by soluble preadipocyte factor-1 (Pref-1)[J]. *J Clin Invest*, 2003, 111(4): 453-461.
- [41] RANTANEN J, HURME T, LUKKA R, et al. Satellite cell proliferation and the expression of myogenin and desmin in regenerating skeletal muscle: evidence for two different populations of satellite cells[J]. *Lab Invest*, 1995, 72(3): 341-347.